

Отзыв

на автореферат диссертационной работы **Кургиной Татьяны Андреевны** на тему «Влияние фактора модификации гистонов HPF1 на активность поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии с нуклеосомами», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Выяснение молекулярных механизмов репарации повреждений ДНК является одной из ключевых проблем в области молекулярной биологии клетки. Известно, что помимо непосредственных участников репарационной машины есть ряд белков, выполняющих вспомогательные функции, но при этом оказывающих существенное влияние на эффективность процессов репарации. К таким белкам относятся представители семейства АДФ-рибозилтрансфераз, в частности поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2 (PARP1 и PARP2). Несмотря на длительную историю их исследования, только сравнительно недавно было обнаружено, что в регуляции их активности важную роль играют белок-белковые взаимодействия. В этой связи чрезвычайно своевременной и востребованной является диссертационная работа Кургиной Т.А., посвященная выяснению некоторых аспектов регуляции каталитической функции белков PARP1 и PARP2 фактором парилирования гистонов 1 (HPF1).

Прежде всего хотелось обратить внимание на неординарность реакции поли(АДФ-рибозил)ирования (PARирования) белков, обусловленную как ее химизмом, так и сложностью молекулярных событий на уровне белок-белковых и белок-ДНКовых взаимодействий, с участием PARP1/2. Эти обстоятельства делают задачу исследования кинетических закономерностей реакции PARирования весьма нетривиальной. Целью диссертационной работы Т.А. Кургиной было выяснить, как HPF1 влияет на различные параметры реакций, катализируемых PARP1/2 в контексте возникновения повреждений ДНК, находящейся в составе нуклеосомы. Для этого диссертантом, наряду с уже апробированными ранее, был предложен и использован ряд новых методов и подходов. В частности, был разработан метод оценки анизотропии флуоресценции для непрерывного анализа скорости реакции PARирования и оценки сродства PARP1/2 к ДНК. Также были сконструированы различные варианты нуклеосом с неповрежденной и поврежденной (брешь) ДНК, и меченые двумя разными флуорофорами. Основной экспериментальный подход базировался на создании искусственных модельных систем «в пробирке», имитирующих взаимодействие PARP1/2 с хроматином и HPF1 в клетке в ситуации, когда возникают новые повреждения ДНК.

Анализ содержания диссертационной работы Кургиной Т.А., основанный на представленных в автореферате материалах, позволяет характеризовать ее как

законченное научное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. В результате проделанной работы было получено множество принципиально новых данных, позволивших сделать ряд не опубликованных ранее заключений и предположений, которые, в свою очередь, могут послужить импульсом для дальнейшего развития исследований в данной области.

Наиболее важные результаты, на мой взгляд, касаются: 1) обнаружения способности HPF1 разнонаправленно регулировать скорость протекания реакции АДФ-рибозилирования белков на стадии инициации и элонгации, ускорение – на первой, и замедление – на второй стадии; 2) выявление более выраженного воздействия этого фактора на PARP2 и 3) установления зависимости степени АДФ-рибозилирования коровых гистонов от места расположения повреждения (бреши) ДНК относительно структуры нуклеосомы. На основе всей совокупности полученных данных диссертант приходит к заключению, что HPF1, видимо, играет ключевую роль на этапе инициации АДФ-рибозилирования белков, что проявляется в существенном возрастании числа сайтов модификации. В то же время для элонгации полимера необходима диссоциация белкового комплекса PARP-HPF1. Таким образом можно заключить, что диссертантом внесен значительный вклад в изучение роли HPF1 в регуляции активности PARP1/2, и прежде всего с точки зрения участия всех этих белков в механизмах репарации повреждений ДНК.

Автореферат содержит все необходимые разделы и дает достаточно полное представление о содержании работы. Приведенные рисунки и таблицы хорошо дополняют текст и значительно облегчают восприятие материала. Сделанные выводы полностью обоснованы и подтверждены приведенными экспериментальными данными. Все результаты исследований опубликованы в ведущих научных журналах и доложены на научных форумах, что свидетельствует об уже проделанной серьезной экспертизе работы.

В то же время к работе есть ряд вопросов, касающихся как содержания, так и оформления материалов исследования, представленных в автореферате.

(1) Ряд выявленных в работе фактов заслуживает более подробного обсуждения и интерпретации. Это, например, касается активирующего эффекта HPF1 на PARP1/2, выражающегося в многократном увеличении начальной скорости реакции при низких концентрациях НАД⁺ (табл. 3). Какова его природа? Другой случай касается того факта, что в присутствии HPF1 число сайтов аутомодификации PARP1 зависит от концентрации НАД⁺, а PARP2 – нет (рис. 9)? Чем это обусловлено?

(2) Ряд исследований проводился при концентрациях НАД⁺ 1-10мкМ. В клетке концентрация НАД⁺ лежит в пределах 300-1000мкМ. Возникает вопрос, какие из

выявленных в работе эффектов HPF1 в отношении PARP1 и PARP2 можно считать существенными, а какие несущественными при функционировании рассматриваемых систем на клеточном уровне?

(3) Мне кажется не совсем корректно применять при описании полученных данных термины и обозначения типа «PAR-илирование», «PAR-PARP1», «PAR-PARP2», «PAR», поскольку в ряде случаев используемые условия эксперимента предполагают наличие только моно- и олиго-АДФ-рибозилирования белков, что кстати совершенно четко видно на автордиограммах, представленных на рисунках 3 и 4. Кроме того, как было показано в работе, избыток HPF1 также способствует формированию коротких цепей АДФ-рибозы. Поэтому корректнее было бы использовать термины «АДФ-рибозилирование», «степень АДФ-рибозилирования белка» и тому подобное.

(4) Одна из основных линий данного исследования – попытка дифференцировать эффекты HPF1 на стадии инициации и элонгации реакции АДФ-рибозилирования белков. Для этого проводился анализ различных показателей, и задавались определенные условия реакции (варьирование концентрации НАД⁺, длительность инкубации). Было бы уместно в ходе изложения основных результатов более четко акцентировать внимание на том, какая преимущественно стадия реакции исследовалась в каждом конкретном случае?

(5) В ряде случаев в подписях к рисункам и таблицам желательно было привести более подробные сведения об условиях эксперимента – концентрации реагентов, время проведения реакции, и др. Это позволило бы более корректно интерпретировать представленные данные. Так, например, из подписи к таблице 3 не ясно, какая была концентрация HPF1, какова длительность инкубации, как проводился анализ модификации гистонов, присутствовал ли в этом случае HPF1? Также хотелось бы отметить, что представление нормированных показателей не позволяет сравнивать разные группы данных в рамках одного исследования, например, число сайтов модификации при разных концентрациях НАД⁺ (рисунок 9). Поэтому желательно в подписи к рисунку отдельно приводить абсолютные значения тех показателей, которые выбирались для нормирования.

(6) В тексте и выводах употребляется термин «гибридный активный центр PARP:HPF1». Учитывая нетривиальность этого термина, а также важность его для обсуждения полученных результатов, было бы целесообразно объяснить его смысл в вводной части автореферата и привести ссылку на работу, в которой был предложен этот термин.

(7) В тексте встречается различное написание одинаковых размерностей («мкМ» и «μМ») и параметров («стандартное отклонение» и «SD»).

Следует отметить, что сделанные замечания не носят принципиального характера и несколько не умаляют многочисленные достоинства данной работы, которая в целом заслуживает самой высокой оценки.

Работа Кургиной Т.А. соответствует требованиям, установленным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Автор диссертации Кургина Т.А. заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - молекулярная биология.

Я, Шрам Станислав Иванович, даю согласие на включение моих персональных данных в документы, связанные с защитой Кургиной Татьяны Андреевны.

Шрам Станислав Иванович,
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
Лаборатории молекулярной фармакологии
пептидов, КК НБИКС-природоподобных
технологий, НИЦ «Курчатовский институт»



/Шрам С. И./

19.11.2023г

Адрес:
НИЦ «Курчатовский институт»
пл. Академика Курчатова, д.2
г. Москва 123182
shram.img@yandex.ru
Тел. +7 905 7008974

Подпись **Шрама Станислав Ивановича** заверяю

Главный ученый секретарь НИЦ
"Курчатовский институт"
Борисов Кирилл Евгеньевич



/Борисов К.Е./